

油松毛虫受球孢白僵菌感染的组织病理学变化

张艳梅, 谢映平*, 薛皎亮, 刘卫敏

(山西大学生命科学学院, 太原 030006)

摘要: 为了研究昆虫病原真菌对松毛虫的致病机理, 提供北方地区松毛虫生物防治的科学依据, 本研究采用球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin 菌株 1573 感染油松毛虫 *Dendrolimus tabulaeformis* Tsai et Liu, 通过扫描电镜和石蜡切片光学显微镜观察技术, 研究了菌株的感染过程和虫体的组织病理学变化。结果表明, 该病原真菌通过穿透表皮入侵油松毛虫, 染菌后 24 h, 观察到分生孢子附着于头部的颅顶, 单眼、触角和口器的基部, 在胸、腹部附着于毛簇、毛瘤、棘状突和节间褶。染菌后 36 h, 孢子萌发长出菌丝, 在入侵部位, 菌丝的端部特化成附着胞和侵入钉。染菌后 48 h, 菌丝依靠机械力和胞外酶的作用穿透表皮, 虫体表皮出现了裂痕和黑化。染菌后 72 h, 菌丝已进入体腔, 感染血淋巴、脂肪体、肌肉、消化道、丝腺和神经组织, 并利用血液和内部组织器官作为营养大量繁殖, 此时, 虫体发胀, 表皮变暗。染菌后 96 h, 菌丝占据了松毛虫的血腔, 内部的组织结构被完全瓦解, 松毛虫死亡。最后, 菌丝冲破体壁, 在尸体表面长出新的分生孢子。这些结果说明, 球孢白僵菌 *B. bassiana* 菌株 1573 是一种油松毛虫的高致病性菌株, 可以引起虫体的一系列组织病理变化而致其死亡。

关键词: 昆虫病原真菌; 球孢白僵菌; 油松毛虫; 扫描电镜; 组织病理学

中图分类号: Q965.8 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2011)05-0531-09

Histopathological changes in *Dendrolimus tabulaeformis* (Lepidoptera: Lasiocampidae) infected by *Beauveria bassiana*

ZHANG Yan-Mei, XIE Ying-Ping*, XUE Jiao-Liang, LIU Wei-Min (College of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: In order to well understand the pathogenesis of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* to pine caterpillar, *Dendrolimus tabulaeformis* Tsai et Liu, and to provide the scientific guidance for biological pest control in northern China, in the present study, *B. bassiana* strain No. 1573 was used to infect the pine caterpillar, *D. tabulaeformis*. The fungal infection process and the host histopathological changes were observed using light microscopy (LM) and scanning electron microscopy (SEM). The results showed that the pathogenic fungus generally infected the pine caterpillar by penetrating the integument. At 24 h after inoculation, the attached conidia were found on the vertex and the regions around ocellis, antenna and mouthpart on the head, while on the thorax and abdomen, they adhered on verrucas, tufts, the acanthae and intersegments. At 36 h after infection, the conidia germinated into hypha on the cuticle, and then the hyphal tip differentiated into appressoria and penetration pegs to penetrate the cuticle. At 48 h, hyphae penetrated the integument depending on both the mechanical pressure and degradation action from hyphal extracellular enzymes, causing cuticular rupture and melanism. At about 72 h after infection, the hyphae had entered the body cavity and infected hemolymph, fat body, muscle, alimentary canal, silk gland and nerve tissue. By utilizing the nutrition of haemolymph and internal organs and tissues, the fungus massively proliferated. The insect body showed swelling and dark. At 96 h after infection, as hyphae occupied the haemocoel, the internal tissue structure of the pine caterpillar was totally destroyed and the insects died. At last, the hyphae broke through the cuticle and released new conidia on the cadaver surface. This study revealed that the strain No. 1573 of *B. bassiana* is an effective pathogen to the pine caterpillar, *D. Tabulaeformis*. It is a series of infection in the integument and inner tissues that causes the host insect to die.

Key words: Entomopathogenic fungus; *Beauveria bassiana*; pine caterpillar (*Dendrolimus tabulaeformis*); scanning electron microscopy; histopathology

基金项目: 山西省科技攻关项目(2007032009); 山西省林业关键技术攻关项目(2010-2012)

作者简介: 张艳梅, 女, 1984 年生, 山西临汾人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫病理学, E-mail: phoebeym@eyou.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: xieyingping@eyou.com

收稿日期 Received: 2010-12-20; 接受日期 Accepted: 2011-03-23

油松毛虫 *Dendrolimus tabulaeformis* Tsai et Liu 是我国北方松林中危害严重的食叶害虫, 频繁暴发成灾。利用化学防治造成了环境污染, 破坏了生态平衡, 难以达到长期防治的效果。白僵菌属 *Beauveria* 是国内外研究和用于害虫生物防治最广泛的一类昆虫病原真菌, 现在世界上已有白僵菌的杀虫制剂 Mycotrol®, BotaniGard®, Naturals® 等, 防治害虫种类已扩大到 60 多种, 包括鳞翅目、半翅目、膜翅目和同翅目等, 我国已报道的白僵菌有 3 种, 分别为球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 或称白僵菌、小球孢白僵菌 *B. globulifera* 和卵孢白僵菌 *B. tenella* (Li et al., 2001), 其中最主要的是球孢白僵菌。关于白僵菌防治松毛虫已有很长的历史, 但主要集中在我国的南方。林华峰等 (1998b) 研究了白僵菌入侵南方马尾松毛虫 *Dendrolimus punctatus* 的组织病变, 并利用该菌大面积防治马尾松毛虫, 取得了理想的效果, 但由于白僵菌侵染松毛虫的发病和流行需要相对高的温度和湿度, 北方的气候不适宜白僵菌的生长和繁殖。因此, 研究白僵菌感染北方松毛虫的致病机理对指导生物防治应用具有重要意义。本实验室于 2002 年在北方油松毛虫越冬幼虫僵尸上分离纯化出一株适应北方气候, 对松毛虫致病性高的球孢白僵菌菌株 (该菌株已经保存在中国科学院微生物研究所国家菌种保藏中心, 保藏编号: CGMCC No. 1573), 并进行了室内毒性测定和林间施菌实验 (谢映平等, 2006; 原贵生等, 2006), 但未涉及到球孢白僵菌对油松毛虫的组织病理学和致病机理。本研究以油松毛虫为试验材料, 利用扫描电镜研究了白僵菌孢子在松毛虫体表的附着、萌发、菌丝生长和入侵体壁的行为和过程, 利用组织切片和显微镜观察研究了白僵菌在体内的感染和对松毛虫内部组织的破坏作用。以探讨球孢白僵菌与油松毛虫之间的相互作用关系, 为有效利用该病原菌在北方地区防治松毛虫提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌种: 球孢白僵菌 *B. bassiana* 菌株 1573 是 2002 年本实验室从山西省灵丘县油松毛虫 *D. tabulaeformis* Tsai et Liu 越冬幼虫自然染病死亡的僵尸上分离纯化后保存的菌种。目前该菌种保藏在中科院微生物研究所国家菌种保藏中心, 保藏号: CGMCC No. 1573。使用时, 用马铃薯葡萄糖琼脂

(PDA) 培养基在 25℃, 10L:14D 的光照条件下培养 7 d, 用含 0.1% 吐温-80 无菌水刮取分生孢子, 经血球计数板计数后, 配成 1.0×10^7 个/mL 孢子悬浮液备用。

供试昆虫: 油松毛虫 *D. tabulaeformis* 是 2009 年从山西省灵丘县 (经度: 114°11', 纬度: 39°27') 油松林内采集的 3~4 龄幼虫, 室内饲养 7 d, 选取大小一致, 活动正常的虫体供试。饲养条件为温度 25℃, 相对湿度 30%~40%, 光周期 12L:12D。

1.2 方法

1.2.1 接种及取样: 取油松毛虫 3~4 龄幼虫 150 头, 分成 5 组, 每组 30 头, 分别用喉头喷雾器向虫体表面均匀喷洒分生孢子悬浮液至虫体湿润, 自然晾 5 min, 分别放入 5 个养虫缸 (20 cm × 20 cm), 每天饲喂新鲜松叶。同时, 取 60 头油松毛虫幼虫分成 2 组, 以喷洒无菌 0.1% 吐温-80 溶液的油松毛虫作对照。将处理过的油松毛虫置于无菌室饲养, 温度 25℃, 相对湿度 70%, 光周期 12L:12D, 连续饲养 7 d, 每隔 12 h 取样 1 次, 观察虫体染菌后的行为反应, 在体视显微镜 (Olympus Optical Co. Ltd., Japan) 下观察外观症状并用数码相机拍照 (Olympus C5050Z)。根据幼虫染病后的活动能力、取食状况的表现和外观症状, 取活动能力较弱、取食量较少的幼虫, 刚死亡的幼虫, 僵硬的幼虫以及白僵菌菌丝穿出体壁的幼虫 (王晓红等, 2009) 浸泡在 2.5% (v/v) 戊二醛溶液中, 于 4℃ 下固定, 每次固定 5 头, 供制备石蜡切片和扫描电镜观察, 同时取正常幼虫做对照。

1.2.2 扫描电镜样品制备与观察: 分别取接菌后 24, 36, 48 h 的固定样品用磷酸缓冲液 (0.2 mol/L) 清洗 3 次, 每次 10 min, 1% 锇酸固定 1.5 h, 再用 35%, 50%, 75%, 85%, 95% 和 100% 的乙醇逐级脱水, 每级 10 min, 醋酸异戊酯置换 20 min, EMS 850 临界点干燥仪干燥 3 h, 真空喷金 5~8 min, 并用 JSM-840 扫描电镜 (JEOL Ltd., Japan) 观察、拍照白僵菌分生孢子油松毛虫幼虫体表的附着、萌发和入侵状况。

1.2.3 透射电镜样品的制备和观察: 分别取染菌后 36, 48 h 的固定样品, 在磷酸缓冲液 0.2 mol/L 中漂洗 3 次, 再用 1% 的锇酸 (0.2 mol/L, pH 7.2 磷酸缓冲液配制) 4℃ 下固定 3 h, 30%, 50%, 70%, 80%, 90% 和 95% 的乙醇逐级脱水 1 次, 100% 乙醇脱水 3 次, 每次 10~15 min, Epon812 渗透、包埋。超薄切片用 Reichert Jung 超薄切片机切

片, 厚度 80 μm , 超薄切片固定在铜网上, 醋酸双氧铀、柠檬酸铅双染色。将制备好的样品用 JEM-1200EX 透射电镜 (JEOL. Ltd., Japan) 观察球孢白僵菌对松毛虫体壁的入侵, 加速电压 80 kV。用 JEM-1200EX 自带的照相装置将图像拍在乐凯透射电镜软片上, 然后冲洗底片, N-TEK Nuscan700 扫描仪扫描。

1.2.4 组织切片样品制备与观察: 分别取接菌后 36, 48, 72, 96, 120 h 和对照组的固定样品在磷酸缓冲液 (0.2 mol/L) 中冲洗 3 次, 每次 10 min, 再用 35%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% 和 100% 的乙醇逐级脱水, 35%, 50%, 75%, 85%, 95% 和 100% 的二甲苯乙醇溶液逐级渗透, 间隔 10 min, 石蜡包埋, 全自动切片机 (Leica RM2255) 切片, 厚度 6 μm , 苏木精-伊红染色, 系列浓度酒精逐级脱水, 中性树胶封片。在光学显微镜 (Olympus BX51) 下观察松毛虫感染白僵菌后的组织病理变化并拍照。

2 结果

2.1 油松毛虫感染球孢白僵菌后的外部症状

体视显微镜下观察发现, 幼虫感染球孢白僵菌后饲养 48 h, 虫体的活动能力和体色无明显变化; 染菌后 72 h, 幼虫取食明显减少, 体色逐渐变暗, 节间褶皱发黑, 虫体肿胀; 染菌后 96 h, 在虫体头部下侧、胸部和前腹部看到白色菌丝, 此时松毛虫已经死亡 (图 1: A); 染菌后 120 h, 菌丝完全覆盖虫体, 耗尽虫体的营养, 虫体萎缩僵硬 (图 1: B)。

2.2 球孢白僵菌在油松毛虫虫体表面的附着、萌发与入侵

油松毛虫幼虫头部骨化较强, 共分为 4 个区, 即颅侧区、额唇基区、颊下区和后头区。单眼位于颅侧区的颊区, 两侧各有 6 只, 呈弧形排列, 单眼间有凹陷; 口器位于额唇基区, 包括上唇、上颚、下颚、下唇和舌, 下颚、下唇和舌合为一个复合体, 其端部有吐丝器; 触角位于口器的上颚两侧。头部密被长短和粗细不一的次生刚毛 (图版 I: A)。油松毛虫被喷洒白僵菌孢子悬浮液后 24 h, 在扫描电镜下观察到分生孢子成功地附着在颅顶、触角基部和单眼周围; 在染菌后 36 h 发现, 分布在颅顶的分生孢子开始萌发长出分生孢子梗, 有的分生孢子梗直接在顶端长出分生孢子, 有的分生孢子梗分枝后再次长出分生孢子 (图版 I: B); 在触角基部的分生孢子能萌发伸出芽管, 有的孢子萌发较快, 已经长

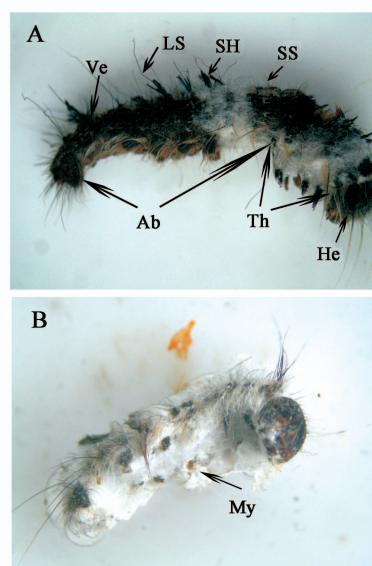


图 1 油松毛虫受球孢白僵菌感染后的外部症状

Fig. 1 Symptoms of *Dendrolimus tabulaeformis* infected by *Beauveria bassiana*

A: 染菌后 96 h, 昆虫胸部 (Th) 和腹部 (Ab) 开始覆盖菌丝 (My) At 96 h after inoculation, the My emerged on Th and Ab of the insect; B: 染菌后 120 h, 菌丝 (My) 覆盖整个虫体 At 120 h after inoculation, the entire body was surrounded by My. He: 头部 Head; Ab: 腹部 Abdomen; Th: 胸部 Thorax; SH: 鳞片状毛 Scale-like hair; LS: 长刚毛 Long stee; SS: 短刚毛 Short stee; Ve: 毛瘤 Verruca; My: 菌丝 Mycelium.

出菌丝, 菌丝分枝后沿着触角表面延伸, 寻找适宜的入侵位点 (图版 I: C); 单眼基部的孢子也已经萌发成菌丝 (图版 I: D)。

松毛虫的胸部和腹部柔软, 密被多种体毛, 包括长度和粗细不等的刚毛、鳞片状毛和棘状突, 刚毛和鳞片状群集成毛簇和毛瘤。鳞片状毛长 250 ~ 300 μm , 主要分布在胸腹部背面各节的前亚背线上; 刚毛有长刚毛和短刚毛, 在虫体的周身都有分布, 长刚毛的长度可达 200 ~ 300 μm , 而短刚毛仅 30 ~ 50 μm , 长、短刚毛常群聚成毛瘤, 分布在各体节的侧面。棘状突长 1 ~ 5 μm , 基部较粗, 约 2 μm , 端部较细, 约 1 μm , 分布于整个虫体表面, 紧贴体壁, 密集排列。在染菌后 24 h 发现, 在鳞片状毛瘤、刚毛的基部和棘状突上都有孢子附着; 在染菌后 36 h 发现, 在鳞片状毛的基部, 孢子已萌发成菌丝 (图版 I: E); 在刚毛着生的毛瘤上, 孢子也萌发成菌丝, 菌丝分枝生长延伸, 有的菌丝可沿着刚毛基部伸向刚毛窝 (图版 I: F); 有的菌丝在刚毛周围生长延伸, 寻找合适的入侵位点, 到达刚毛基部的菌丝, 末端膨大形成附着胞, 附着胞顶端

再形成侵入钉,开始向体壁穿刺(图版 I:G);附着在棘状突上的分生孢子萌发成菌丝,生长延伸,遇到合适的侵入位点便形成侵入钉,刺入体表(图版 I:H)。

胸腹部的节间褶是体壁的薄弱环节,也是病原孢子和菌丝容易附着和聚集的区域。在染菌 24 h 后发现,节间褶内的孢子已经萌发成芽管,部分芽管已长出菌丝,向节间膜处延伸(图版 I:I),染菌 36 h 后,节间褶内已有大量的菌丝生长,部分菌丝侧向分枝,并开始向体壁穿透(图版 I:J);菌丝在虫体表面感染过程中,分泌酶液,分解表皮,使表皮组织破坏,出现裂痕和空洞(图版 I:K);随后,大量菌丝通过这些裂痕穿透体壁(图版 I:L)。

2.3 球孢白僵菌对油松毛虫体壁的入侵

透射电镜观察显示,松毛虫的体壁由外而内依次为上表皮、原表皮、真皮层和基膜。上表皮厚度约 $1 \sim 3 \mu\text{m}$,其表面有均匀排列的棘状突,原表皮厚度 $16 \sim 18 \mu\text{m}$,在原表皮内可见清晰的几丁质横纹结构,上表皮和原表皮组成表皮层,在原表皮层下是真皮层,它是一层紧密排列的真皮细胞,真皮层之下是极薄的基膜(图 2:A)。染菌后 48 h,在体壁的原表皮和真皮层内都看到了入侵的菌丝,它们以横向或纵向的方式在体壁内穿刺(图 2:B)。放大后可见菌丝在表皮层内使蛋白质和几丁质交叠形成的横纹结构发生了明显变形,菌丝与表皮之间还出现了空隙(图 2:C)。

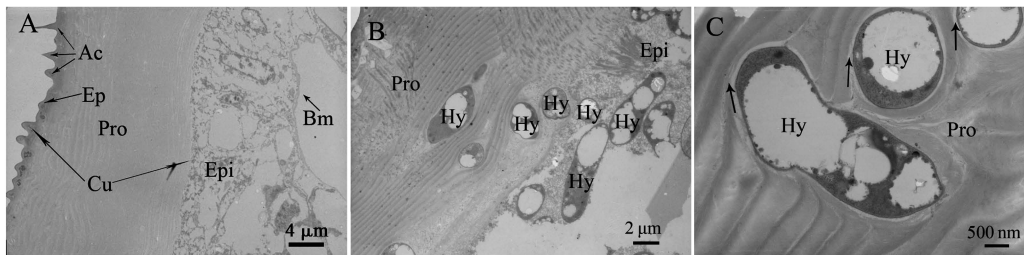


图 2 球孢白僵菌感染油松毛虫的透射电镜图

Fig. 2 TEM photographs of *Dendrolimus tabulaeformis* infected by *Beauveria bassiana*

A: 正常的表皮结构, 示上表皮(Ep)、原表皮(Pro)、真皮层(Epi)、基膜(Bm)、表皮层(Cu)和棘状突(Ac) Normal integument structure, showing the Ep, Pro, Epi, Bm, Cu and Ac; B: 原表皮(Pro)和真皮层(Epi)内的菌丝(Hy) Hy within the Pro and Epi; C: 菌丝(Hy)入侵, 引起了原表皮的变形(如箭头所示) The invasion of Hy resulted in the deformation of the Pro (shown with arrow). Ac: 棘状突 Acanthae; Bm: 基膜 Basement membrane; Cu: 表皮层 Cuticle; Ep: 上表皮 Epicuticle; Epi: 真皮层 Epidermis; Hy: 菌丝 Hypha; Pro: 原表皮 Procuticle.

2.4 球孢白僵菌对虫体的体壁和内部器官的侵染

组织切片观察表明:染菌后 36 h,虫体的整体结构基本完整,在横切面上可以看到沿着背中线的背血管和血管两侧的数对围心细胞,沿着腹中线的腹神经索,在围脏窦的正中央是消化道,消化道的腹面分布有丝腺,侧面有一对气管主干和由主气管向背面和腹面分支形成的背气管和腹气管,消化道和体壁之间的血腔内分布有肌肉和脂肪,肌肉紧贴于体壁的内面和消化道的表面,呈条状或块状,脂肪体则分布在血腔内,以条形存在(图版 II:A)。染菌后 48 h,在松毛虫的体表可以看到有大量菌丝附着,在体表的节间褶和毛瘤处附着的菌量更多。在节间褶处菌丝附着的位点,体壁的部分上表皮消失,说明菌丝在入侵的过程中已经分泌了胞外蛋白酶和几丁质酶,使表皮组织发生了降解,然后菌丝在原表皮内垂直或平行穿行,原表皮与皮细胞层发生了分离,部分菌丝已经进入了血腔内(图版 II:

B);在毛瘤的基部,菌丝通过刚毛窝进入内表皮和毛原细胞,使皮细胞层与内表皮发生分离;大量菌丝在毛原细胞内繁殖,菌丝入侵处体壁和毛原细胞都出现黑化,部分菌丝已经进入了血腔(图版 II:C)。染菌后 72 h,进入血腔的菌丝出芽繁殖,产生大量的芽生孢子,芽生孢子继续发育成菌丝,入侵背血管,血管断裂,入侵的菌丝在血管内形成新的芽生孢子繁殖,血管两侧的围心细胞受感染后,细胞核空洞,细胞质疏松或分裂。周围的肌肉受感染后开始出现疏松现象(图版 II:D);同时,病原菌继续感染神经节、消化道、丝腺、脂肪组织等其他组织器官,神经节受害初期的结构还比较清晰,从内到外依次是神经髓、神经细胞体、神经鞘细胞和神经围膜(图版 II:E),随着感染的加剧,神经细胞体先出现了轻微的黑化,接着神经髓萎缩,部分神经细胞体溶解,出现严重的黑化。但是在神经节内并未发现明显的菌丝(图版 II:F)。

消化道受感染后, 许多菌丝使前肠的肠壁肌肉破坏, 入侵到肠内的内膜(图版 II: G); 菌丝也穿过了中肠纵肌的间隙, 入侵环肌, 到达了肠壁细胞, 中肠的柱形细胞和杯形细胞的细胞核脱落, 形成了空泡(图版 II: H)。丝腺是附着在消化道上, 贯穿体纵轴的一条管状器官, 由前至后包括吐丝管、前部丝腺、中部丝腺和后部丝腺, 中部丝腺直径最大。丝腺组织由底膜、丝腺细胞、内膜和腺腔组成, 腺腔内有丝素或丝胶。中部丝腺受感染后, 菌丝首先穿过丝腺的底膜, 使底膜断裂或丝腺细胞的细胞质内陷, 然后细胞核出现分散或凝聚, 但丝素还相对完整(图版 II: I)。感染后 96 h, 后部丝腺被菌丝占据, 组织完全模糊(图版 II: J)。肌肉组织在体腔内主要分布于体壁下和消化道周围, 受病原菌感染后, 脂肪小球开始松散, 部分脂肪小球的细胞核脱落; 感染后期, 脂肪被菌丝消耗, 组织结构变得完全模糊, 如图 3J 所示。感染的肌肉组织内也充满了菌丝, 肌肉分裂(图版 II: K)。接种后 120 h, 虫体早已死亡, 体腔内充满了菌丝, 菌丝再分解体壁, 向体壁外生长扩散, 穿出表皮的菌丝堆积在虫体的表面(图版 II: L)。

3 讨论

Shah 和 Pell (2003) 认为虫生真菌入侵昆虫的专化性与寄主表皮构造有密切关系。本研究发现球孢白僵菌菌株 1573 的分生孢子在油松毛虫头壳上主要附着在头顶、触角基部、单眼和口器周围。其中在头顶的分生孢子出现微循环的生长方式, 首先分生孢子膨大, 长出分生孢子梗, 然后孢子梗分枝生长, 在顶端又长出分生孢子, 这类孢子的大小与正常的白僵菌孢子大小一致, 这与附着于其他部位的分生孢子萌发出芽管, 芽管发育成菌丝, 入侵体壁的方式是不一样的。微循环产孢是指丝状真菌在(有性或无性)孢子萌发后无营养菌丝生长, 或仅有极微弱菌丝生长而直接重复产孢的现象。黄秀梨等(1992)将在紫外线或高温下处理过的球孢白僵菌分生孢子转移至固体培养基上培养时, 也发现了球孢白僵菌微循环产孢现象。Hanlin (1994) 及 Bosch 和 Yantorno (1999) 认为这种真菌的微循环产孢是适应不良环境的一种保护机制, 高温、营养缺陷或者抑制营养生长的其他因素均可以诱导丝状真菌进行微循环。本研究观察到真菌分生孢子在颅顶区的微循环现象, 可能是头壳表面骨化较强, 湿度

较小, 不利病原真菌正常发育的缘故。

王晓红等(2009)研究发现昆虫体表的光滑状况、刚毛或小刺等次生结构对病原真菌的入侵行为有明显影响, 桑天牛 *Apriona germari* 幼虫属于光滑类型, 在幼虫体壁平缓的区域, 感染的白僵菌容易形成附着胞或芽管, 很快入侵体壁。而在不适宜的体表处, 菌丝就进行平行生长, 待遇到合适的侵入点时再产生侵入行为。王音等(2005)也报道绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 入侵小菜蛾 *Plutella xylostella* 体表时, 在平缓结构区和刺状结构区比嵴状结构区更易形成附着胞和侵入钉, 且芽管较短。与桑天牛幼虫和小菜蛾幼虫的体表不同, 松毛虫幼虫浑身密被多种体毛, 在胸部和腹部, 体毛包括长度和粗细不等的刚毛和鳞片状毛, 散生、群集成毛簇或着生于毛瘤上, 毛簇主要分布于胸、腹部背面各节的前亚背线上, 毛瘤主要分布在各体节的侧面。本研究在 SEM 下还发现, 紧贴虫体表面密被一层棘状突, 棘状突长 1 ~ 5 μm , 基部较粗, 约 2 μm 。这些体毛和棘状突都是虫体自身抵御外界因子入侵的屏障。林华峰等(1998a)研究白僵菌侵染南方马尾松毛虫表皮时发现白僵菌仅能通过体表的棘状突穿透表皮, 但在本研究中发现, 白僵菌菌株 1573 的分生孢子除了能在棘状突上附着、萌发和穿透体壁外, 还能附着在刚毛和鳞片状毛的基部以及长刚毛上, 孢子萌发形成芽管或菌丝, 其末端形成附着胞和侵入钉, 刺入昆虫的表皮。在石蜡切片中也观察到菌丝能通过刚毛窝进入表皮和毛原细胞。此外, 本研究还发现节间褶是体表的薄弱环节, 是孢子和菌丝最易群集附着和入侵的部位, 由此说明本研究采用的这株采自北方的球孢白僵菌对油松毛虫的侵染和穿透能力更强。

宋入梅等(2006)研究白僵菌侵染甜菜夜蛾 *Laphygma exigua* (Hubner) 时表明了白僵菌穿透甜菜夜蛾表皮是机械压力和胞外酶降解联合作用的结果。冯明光(1998)发现球孢白僵菌胞外蛋白酶的活力与白僵菌对血黑蝇 *Melanoplus sanguinipes* 的毒力有密切相关性。本文观察到球孢白僵菌菌株 1573 在松毛虫表皮侵染过程中, 将体壁表面造成明显的裂痕和空洞, 菌丝由这些部位进入体壁, 说明了在菌丝穿透表皮的过程中除了机械力的作用, 还有胞外酶的降解作用。昆虫表皮的主要成分是蛋白质、几丁质和脂质, 白僵菌在穿透的过程中分泌了胞外蛋白质酶、几丁质酶和酯酶, 促进菌丝的成功入侵。

当菌丝穿透体壁进入体腔后,球孢白僵菌菌株 1573 能利用油松毛虫血腔内的营养物质进行繁殖,然后感染血淋巴、肌肉、脂肪体、消化道、丝腺和神经节,这与白僵菌感染亚洲玉米螟和甜菜夜蛾的研究结果相似(张爱文等,1994;宋入梅等,2006)。在菌丝入侵过程中还发现油松毛虫的表皮和神经节产生了黑化现象,这是它的一种免疫反应。Chouvenec 等(2009)研究昆虫病原真菌 *Metarhizium anisopliae* 感染黄胸散白蚁 *Reticulitermes flavipes* 时,发现在菌丝入侵表皮处,血腔内的血细胞大量聚集在菌丝的附近,形成包裹并分解入侵的菌丝,使表皮黑化。Butt 等(1988)研究圆孢虫疫霉 *Erynia radicans* 感染马铃薯小绿叶蝉 *Empoasca fabae* 时也发现了类似的现象,认为黑化与多酚氧化酶有关系。在研究蚕的防御反应时也发现了蚕的血细胞能合成多酚氧化酶,血腔内的多酚氧化酶能通过皮细胞输入表皮中,使表皮黑化(Iwama and Ashida, 1986; Ashida and Brey, 1995; Asano and Ashida, 2001)。Wright 等(1998)认为黑化现象是由于真菌在侵染过程中产生的毒素所致。因此,本研究发现油松毛虫的黑化现象可能是由病原菌与昆虫细胞相互作用过程中的多种因素作用的结果。

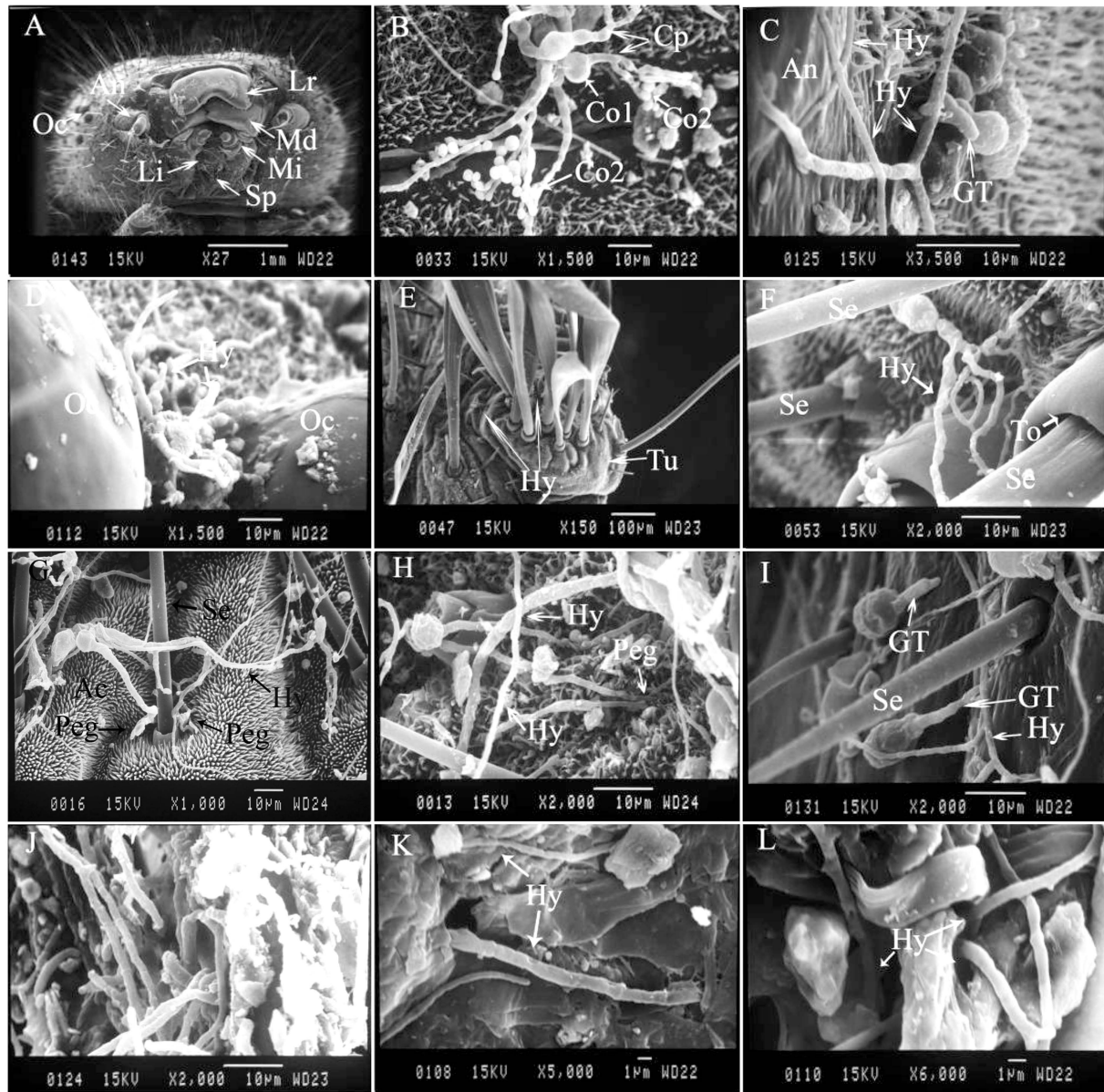
综上所述,球孢白僵菌菌株 1573 是采自北方油松毛虫的一株高毒力病原菌株,它不仅能在虫体表面的刚毛、鳞片状毛、毛瘤、毛簇和棘状突上附着,萌发和穿刺表皮,而且能分泌蛋白质酶、几丁质酶和酯酶,使体壁降解,达到成功入侵。它克服虫体的免疫力入侵到体腔内,菌丝能吸收血淋巴和内部组织的营养物质大量繁殖,使神经、肌肉、脂肪体、消化道和丝腺等受到感染和破坏,导致松毛虫死亡。最后菌丝再长出体外,释放出新的分生孢子,形成新的病原扩散。因此,本研究结果证明,开发该菌株成为生物杀虫剂在北方地区对油松毛虫进行生物防治,对实现松毛虫的可持续防治具有重要意义。

参 考 文 献 (References)

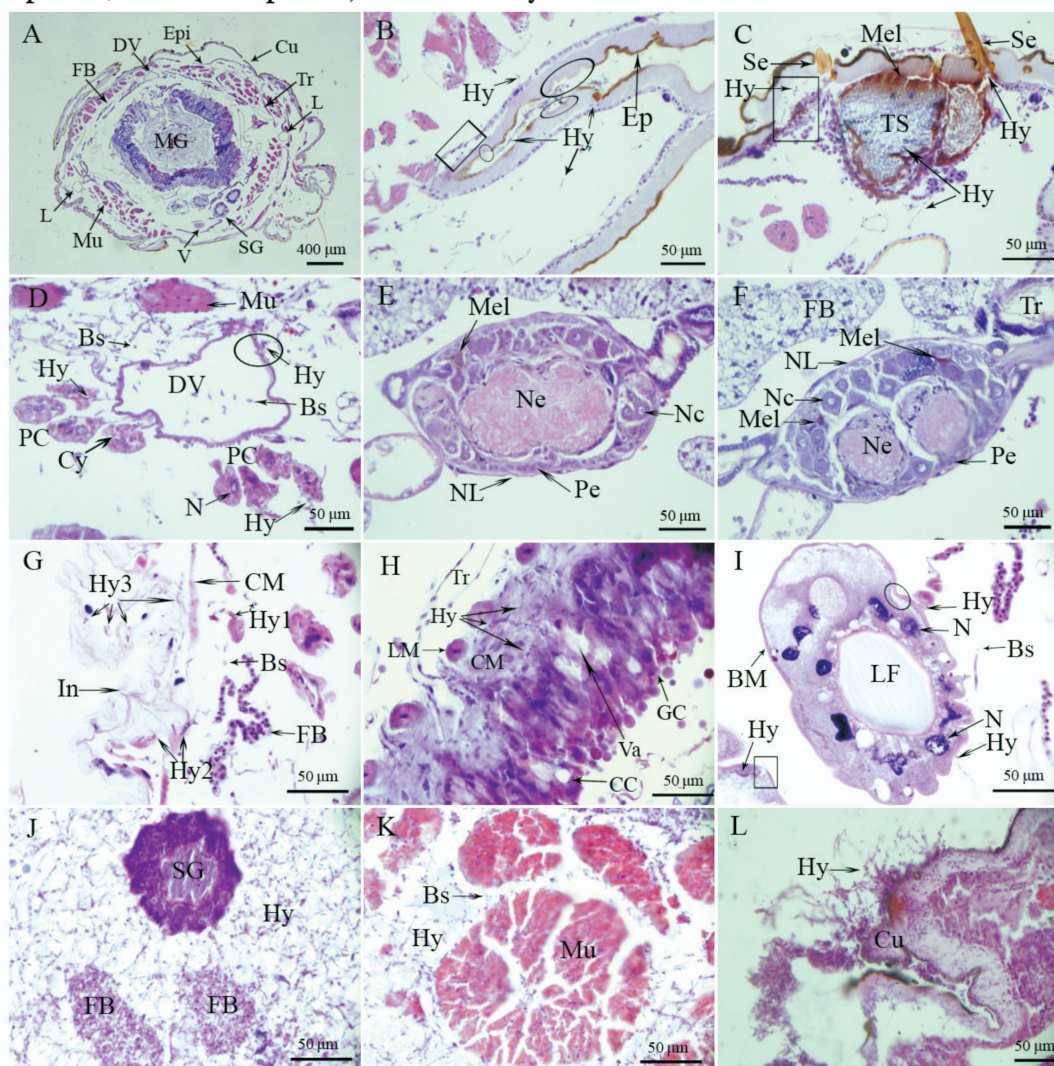
- Asano T, Ashida M, 2001. Cuticular pro-phenoloxidase of the silkworm, *Bombyx mori*. Purification and demonstration of its transport from hemolymph. *J. Biol. Chem.*, 276(14): 11100–11112.
- Ashida M, Brey PT, 1995. Role of the integument in insect defense: pro-phenol oxidase cascade in the cuticular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(23): 10698–10702.
- Bosch A, Yantomo O, 1999. Microcycle conidiation in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* bals. (vuill.). *Process Biochemistry*, 34(6–7): 707–716.
- Butt TM, Wraight SP, Galaini-Wraight S, Humber RA, Roberts DW, Soper RS, 1988. Humoral encapsulation of the fungus *Erynia radicans* (Entomophthorales) by the potato leaf hopper, *Empoasca fabae* (Homoptera: Cicadellidae). *J. Invertebr. Pathol.*, 52(1): 49–56.
- Chouvenec T, Su NY, Robert A, 2009. Cellular encapsulation in the eastern subterranean termite, *Reticulitermes flavipes* (Isoptera), against infection by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.*, 101(3): 234–241.
- Feng MG, 1998. Reliability of extracellular protease and lipase activities of *Beauveria bassiana* isolates used as their virulence indices. *Acta Microbiologica Sinica*, 38(6): 461–467. [冯明光, 1998. 胞外蛋白酶和脂酶活性作为球孢白僵菌毒力指标的可靠性分析. 微生物学报, 38(6): 461–467]
- Hanlin RT, 1994. Microcycle conidiation – a review. *Mycoscience*, 35(1): 113–123.
- Huang XL, Fu SJ, Rong Q, Dai ZX, 1992. Study on the intercellular metachromatin and germination of the spores from the fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Beijing Normal University (Natural Science)*, 28(3): 387–391. [黄秀梨, 付善江, 荣倩, 代忠新, 1992. 球孢白僵菌的孢子萌发以及细胞内异染质的研究. 北京师范大学学报(自然科学版), 28(3): 387–391]
- Iwama R, Ashida M, 1986. Biosynthesis of prophenoloxidase in hemocytes of larval hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.*, 16(3): 547–555.
- Li ZZ, Li CR, Huang B, Fan MZ, 2001. Discovery and demonstration of the teleomorph of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., an important entomogenous fungus. *Chinese Science Bulletin*, 46(9): 751–753.
- Lin HF, Huang B, Li ZZ, 1998a. Electron microscopic scanning observation of the survival and infection of *Beauveria bassiana* on *Dendrolimus punctatus*. *Mycosystema*, 17(4): 344–348. [林华峰, 黄勃, 李增智, 胡萃, 1998a. 白僵菌在松毛虫体上宿存侵染的电镜扫描观察. 菌物系统, 17(4): 344–348]
- Lin HF, Li ZZ, Hu C, 1998b. Histopathological changes of *Dendrolimus punctatus* infected with *Beauveria bassiana* under different environmental conditions. *Journal of Anhui Agricultural University*, 25(4): 330–335. [林华峰, 李增智, 胡萃, 1998b. 不同环境中松毛虫感染白僵菌过程的组织病理变化. 安徽农业大学学报, 25(4): 330–335]
- Shah PA, Pell JK, 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 61(5–6): 413–423.
- Song RM, Wang YB, Li RJ, Dong JZ, Li J, Wang RX, 2006. Study on histopathological changes of *Laphygma exigua* (Hubner) infected by *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 21(B11): 171–174. [宋入梅, 王云滨, 李瑞军, 董建臻, 李静, 王瑞晓, 2006. 甜菜夜蛾感染白僵菌、绿僵菌后的病症及组织病理学变化. 华北农学报, 21(B11): 171–174]
- Wang XH, Huang DZ, Yang ZQ, Li HP, Zheng JW, 2009. Microscopic observations of infection process of *Beauveria bassiana* on the cuticle of *Apriona germari* larvae. *Science of Sericulture*, 35(2): 374–

378. [王晓红, 黄大庄, 杨忠岐, 李会平, 郑建伟, 2009. 白僵菌感染桑天牛幼虫致病过程的显微观察. 蚕业科学, 35(2): 374-378.]
- Wang Y, Lei ZR, Zhang QW, Wen JZ, 2005. Microscopic observations of infection process of *Metarhizium anisopiae* on the cuticle of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Acta Entomol. Sin.*, 48(2): 188-193. [王音, 雷仲仁, 张青文, 问锦曾, 2005. 绿僵菌感染小菜蛾体表过程的显微观察. 昆虫学报, 48(2): 188-193]
- Wraight SP, Carruthers RI, Bradley CA, Jaronski ST, Lacey LA, Wood P, Galaini-Wraight S, 1998. Pathogenicity of the entomopathogenic fungi *Paecilomyces* spp. and *Beauveria bassiana* against the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *J. Invertebr. Pathol.*, 71(3): 217-226.
- Xie YP, Yuan GS, Xue JL, Wang GC, Niu Y, Fan LH, 2006. Preparation Method and Application of a Preparation of *Beauveria bassiana* for Controlling the Pine Caterpillars. State Intellectual Property Office of the People's Republic of China, Patent Number: ZL200610012324.2. [谢映平, 原贵生, 薛皎亮, 王国昌, 牛宇, 范丽华, 2006. 一种用于防治松毛虫的白僵菌制剂及其制备方法和应用. 中华人民共和国国家知识产权局, 专利号: L200610012324.2]
- Yuan GS, Xie YP, Niu Y, Xue JL, Wang GC, 2006. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* to *Dendrolimus tabulaeformis* in Shanxi forest. *Chinese Journal of Biological Control*, 22(2): 118-122. [原贵生, 谢映平, 牛宇, 薛皎亮, 王国昌, 2006. 白僵菌对山西林区油松毛虫的致病效果. 中国生物防治, 22(2): 118-122]
- Zhang AW, Deng CS, Nong XQ, Ren SX, Xu CR, 1994. Study on pathology of *Ostrinia furnacalis* after infection with *Beauveria bassiana*. *Chinese Journal of Biological Control*, 10(4): 151-156. [张爱文, 邓春生, 农向群, 任淑仙, 徐崇仁, 1994. 亚洲玉米螟感染白僵菌后组织病理学研究. 生物防治通报, 10(4): 151-156]

(责任编辑: 赵利辉)



A: 头部照片, 示骨化的头壳和它上面的单眼(Oc)、触角(An), 口器的上唇(Lr)、下唇(Li)、上颚(Md)、下颚(Mi)和吐丝器(Sp) Photograph of the head, showing the sclerised head capsule with Oc, An, and mouthparts including Lr, Li, Md, Mi and Sp; B: 头壳上附着的分生孢子(Co1), 孢子萌发出孢子梗(Cp), 孢子梗端部新产生的分生孢子(Co2) On the head capsule, attached Co1 germinated into Cp that produced new conidia Co2; C: 触角(An)基部附着的孢子(Co)萌发出芽管(GT), 分枝的菌丝(Hy)延伸生长寻找适宜的入侵位点 Around the base of the An, the attached Co germinated into GT and Hy was branching and extending to explore a favorable penetration site; D: 位于单眼(Oc)间的菌丝(Hy) Hy located between the Oc; E: 菌丝(Hy)附着在鳞片状的毛基部 Hy attached around the base of SH; F: 刚毛瘤上菌丝(Hy)正在向刚毛窝(To)处生长 Hy on setiferous tubercle extending toward the To; G: 虫体表面密布大量棘状突(Ac)和刚毛(Se), 菌丝(Hy)的前端特化成侵入钉(Peg), 从刚毛基部向下穿刺 Massive Ac and Se on the body surface, showing the Hy around the Se differentiated into Peg at the tips to penetrate into the cuticle; H: 沿着棘状突(Ac)生长的菌丝及其对体壁的穿刺状 Hy grew along the Ac and their penetration into integument; I: 节间褶处的孢子萌发成芽管(GT)和菌丝(Hy) Along the intersegment, Co had germinated into GT and Hy; J: 节间褶处的大量菌丝入侵 A mass of Hy were penetrating in the intersegment; K: 菌丝感染的过程中, 表皮出现了裂痕和空洞 Many ruptures and holes were visible on the cuticle during the fungal infection; L: 菌丝通过这些裂口和空洞进入体壁 Hy penetrated into the cuticle via these gaps and holes. Ac: 棘状突 Acanthia; An: 触角 Antenna; Co: 分生孢子 Conidia; Cp: 孢子梗 Conidiophore; GT: 芽管 Germ tube; Li: 下唇 Labium; Lr: 上唇 Labrum; Md: 上颚 Mandible; Mi: 下颚 Maxillae; Oc: 单眼 Ocelli; Peg: 侵入钉 Penetration peg; Se: 刚毛 Setae; SH: 鳞片状毛 Scale-like hair; Sp: 吐丝器 Spinneret; To: 刚毛窝 Tormogen; Ve: 毛瘤 Verruca.



A: 虫体的横切面, 示虫体的表皮(Cu)、真皮层(Epi)、侧气管干(L)、气管(Tr)、丝腺(SG)、肌肉(Mu)、脂肪体(FB)、背血管(DV)、腹神经索(V)和中肠(MG) Transverse section of the insect body, showing the Cu, Epi, L, Tr, SG, Mu, FB, DV, V and MG; B: 附着在节间褶处的菌丝(Hy)分解了部分上表皮(Ep)(如圆圈所示), 垂直穿入原表皮, 使表皮与真皮层发生了分离(如方框所示), 并有少量菌丝进入了血腔 Hy located in the intersegmental space degraded the Ep (showing in circle) and then penetrated the procuticle, that caused the procuticle to separate with epidermis (showing in pane). Meanwhile, a few of Hy had entered the haemocoel; C: 菌丝 Hy 通过刚毛窝进入内表皮和毛原细胞(TS), 内表皮层的菌丝使内表皮与皮细胞层发生了分离(如方框所示), 毛原细胞内的感染使表皮与毛原细胞都出现了黑化(Mel), Hy entered the endocuticle and TS via seta alveolus, the Hy in the endocuticle made endocuticle and epidermis separated (showing in the pane), the hyphal infection made the Mel occur inside cuticle and TS; D: 菌丝在体腔内靠芽生孢子(Bs)繁殖, 侵染背血管(DV)和围心细胞(PC), 背血管发生断裂(如圆圈所示), 围心细胞的细胞核(N)和细胞质(Cy)受损 Hy proliferated in haemocoel by Bs and infected the DV and PC, the DV ruptured (showing in circle) and the N and Cy were damaged in PC; E: 感染初期的神经节, 显示神经细胞出现了轻微的黑化(Mel) A nerve node infected in early time, showing slight Mel; F: 受感染的神经节, 神经髓(Ne)出现了萎缩, 神经细胞体(Nc)溶解并黑化(Mel) The infected nerve node, showing the atrophy of Ne and Nc degraded and Mel; G: 前肠被感染, 在血腔、环肌(CM)和内膜(In)上看到菌丝, 分别表示为Hy1, Hy2 和 Hy3 Foregut was infected and hyphae were visible on the haemocoel, CM and In, showing as Hy1, Hy2 and Hy3, respectively; H: 中肠被感染, 显示环肌(CM)和纵肌(LM)以及柱形细胞(CC)和杯形细胞(GC), 空泡化(Va) The infected middle gut, showing the CM and LM infected and the CC and the GC become Va; I: 丝腺中部的病变, 示底膜(BM)断裂(如方框所示), 细胞质内陷(如圆圈所示), 细胞核(N)分散或凝聚, 腺腔内的液状丝素(LF)还是完整的 Pathological changes of the middle silk gland, showing the rupture of the BM (showing in pane), cytoplasmic infolding (showing in circle), and fission and agglomerate of the N, while LF in the gland lumen is complete; J: 菌丝占据了后部的丝腺(SG)和脂肪体(FB) Hy colonized the hind SG and FB; K: 感染使肌肉(Mu)分裂 Mu was split by fungal infection; L: 大量的菌丝正从已经死亡昆虫的表皮穿出 Massive hyphae were released through the cuticle of the dead insect. BM: 底膜 Basement membrane; Bs: 芽生孢子 Blastospore; CC: 柱形细胞 Columnar cells; CM: 环肌 Circular muscle; Cu: 表皮 Cuticle; Cy: 细胞质 Cytoplasm; DV: 背血管 Dorsal vessel; Ep: 上表皮 Epicuticle; Epi: 真皮层 Epidermis; FB: 脂肪体 Fat body; GC: 杯形细胞 Goblet cells; Hy: 菌丝 Hypha; In: 内膜 Intima; L: 侧气管干 Lateral tracheal trunk; LF: 液状丝素 Liquid fibroin; LM: 纵肌 Longitudinal muscle; Mel: 黑化 Melanization; MG: 中肠 Middle forg; Mu: 肌肉 Muscle; N: 细胞核 Nucleolus; Ne: 神经细胞体 Neurocyte; Ne: 神经髓 Neuropile; NL: 神经围膜 Neural lamella; PC: 围心细胞 Pericardial cells; Pe: 鞘细胞层 Perineurium; SG: 丝腺 Silk gland; Tr: 气管 Trachea; TS: 毛原细胞 Trichogen cell; V: 腹神经索 Ventral nerve cord; Va: 空泡化 Vacuolation.